Titre de la séance : TP1/ Chapitre 2. La spécificité de la réaction antigène – anticorps : le test d'Ouchterlony.

Travail de réflexion : la méthode repose sur l'immunodiffusion : les solutions sont déposées dans des puits et diffusent de façon homogène dans toutes les directions autour du puits. Deux auréoles de diffusion de deux puits différents peuvent donc entrer en contact lorsqu'elles ont suffisamment progressé.

- La zone de contact reste invisible s'il n'y a pas de réaction entre les deux solutions.
- Elle se traduit par un arc de précipitation visible à l'œil nu lorsque les deux solutions réagissent.

On veut démontrer la spécificité des anticorps (ici AC anti-BSA) vis-à-vis d'antigène(s). Pour cela, on formule 3 hypothèses :
H1. L'AC anti-BSA est capable de reconnaître toutes les molécules d'albumine.
H2. L'AC anti-BSA ne reconnaît que les albumines bovines.
H3. L'AC anti-BSA ne reconnaît que l'albumine de sérum de bœuf.
On teste ces trois hypothèses par la méthode d'immunodiffusion, ou test d'Ouchterlony.

Matériel à votre disposition :

- une boîte de Pétri contenant de l'agar coulé, deux boîtes de Pétri vides, agar, balance de précision, spatule, 2 béchers, pipette de 10 mL et propipette, bec électrique, pince en bois, emporte-pièce, cure-dent, pipette compte-gouttes, marqueur, feuille de papier noir (lecture des résultats,
- sérum de lapin contenant des anticorps anti BSA (Albumine de Sérum de Bœuf) = S (rouge),
- différents antigènes :

* sérum de chèvre (contient de l'albumine) = H (rose) * albumine de lait de vache = L (mauve)
* albumine de sérum de bœuf = B (blanc) * albumine de sérum de cheval = C (gris) * eau distillée = E (noir)

Travail à faire :

- **Réaliser** un tableau des conséquences vérifiables de chaque hypothèse concernant les résultats possibles des réactions entre le sérum S et les différents antigènes (**arc ou non**).
- **Préparer** la gélose pour la ou les boîtes vides.
- **Effectuer** les puits dans les boîtes que vous avez réalisées, et dans les boîtes fournies.
- **Réfléchir** à l'emplacement des différents produits (m'appeler avant pour validation)
- **Réaliser** les dépôts des différents produits.
- **Réaliser** un schéma des résultats expérimentaux.
- **Analyser** les résultats et valider la bonne hypothèse.

Protocoles : *les manipulations doivent se faire sur un plan de travail propre et bien débarrassé.*

* Réalisation du gel d'Agar (à 2 %) des boîtes de Pétri vides :

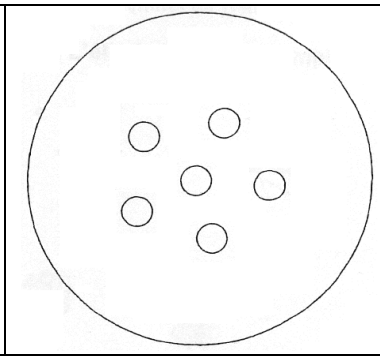
- **Peser** dans un papier 0,2g d'Agar prélevé à l'aide de la spatule (tarer la balance avant !).
- **Verser** 10 mL d'eau distillée puis l'Agar dans le Bécher et **dissoudre** soigneusement l'Agar avec la spatule.
- **Chauffer** le mélange en remuant à la spatule jusqu'à ce que le mélange devienne limpide et arrêter au tout début de l'ébullition.
- **Retirer** à l'aide de la pince en bois et **attendre** quelques secondes pour manipuler le bécher sans se brûler.
- **Pipeter** 5 mL de gel d'Agar chaud et fluide et le **verser** dans une boîte de Pétri.
- **Egaliser** le niveau et **supprimer** rapidement les bulles.
- Ne pas remuer les boîtes pendant dix minutes au moins (prise de l'Agar).

* Creusement des puits et répartition des produits :

- **Creuser** les puits avec l'emporte-pièce selon le modèle ci-contre. En cas de problème, quelques boîtes supplémentaires sont à votre disposition. **Éviter** surtout les fissures et les bords non nets. Pour cela, entrainez-vous d'abord sur vos propres boîtes.

- **Éliminer** éventuellement les disques de gélose avec un cure-dent.

- **Réfléchir** à l'emplacement des différents produits (sérum et anticorps) puis m'appeler pour validation. **Marquer** ensuite sur la boîte de Pétri leur disposition, permettant de révéler la réaction de l'anticorps étudié avec les différents antigènes proposés (marquage sous la boîte ou sur la tranche, surtout pas sur le couvercle !).



* Réalisation des dépôts des produits dans les puits :

- **Réaliser** les dépôts des substances proposées dans les puits de la boîte fournie. Pour cela, la solution est prélevée dans le tube avec une pipette propre et doit être déposée dans le puits sans débordement ni bulles, et sans endommager le gel d'Agar (les puits doivent être bien remplis).
- On attend au moins 24 heures avant de voir les résultats.

Communication des résultats :

- Résultats des boîtes qui sont exploitables.
- Tableau des conséquences vérifiables des hypothèses rempli et titré.
- Validation de l'hypothèse.
- Schéma explicatif (ultérieurement).

Titre de la séance : TP2/ Chapitre 2. La spécificité antigène – anticorps : aspect moléculaire.

Travail de réflexion : on veut montrer la spécificité antigène-anticorps (au niveau moléculaire).

Matériel à votre disposition :
- Logiciel Rastop et livre.

Travail à faire :
- **Exploitation** du logiciel Rastop.
- **Déterminer** la structure de l'anticorps (immunoglobuline)
- **Effectuer** un schéma simplifié et légendé de la structure de l'anticorps
- **Comprendre** la notion de spécificité anticorps-antigène

Protocoles :
Il est possible d'observer la structure d'un anticorps pas le logiciel *RasTop* (mode d'emploi : répertoire classe).
- **Ouvrir** Rastop puis **sélectionner** la séquence IGG-TOTAL.pdb dans le répertoire bankmol (12-immunologie). Apparaît alors à l'écran une molécule d'anticorps circulant, anti-lysozyme.
- **Représenter** la molécule d'anticorps en sphères (atomes avec couleurs conventionnelles).
- **Rechercher** le nombre de chaînes d'acides aminés qui constituent cet anticorps. Pour cela, **aller** dans le menu « atome » puis « colorer par chaîne ». **Noter** vos observations. *Remarque : la partie en rouge correspond à un glucide qui est hors-programme. Vous pouvez l'effacer en le sélectionnant et en l'effaçant.*
- On veut maintenant visualiser les liaisons entre les diverses chaînes. Pour cela, il faut changer de mode de représentation. On fait tout d'abord apparaître le squelette carboné : pour cela **aller** dans le menu « ruban » « squelette carboné ». Par la suite, il faut **effacer** les atomes dans « atomes » « représentation – effacer ».
- Pour **visualiser** les liaisons, il faut désormais les faire apparaître, et notamment celles qui sont intéressantes : il s'agit de ponts disulfures (liaison covalente entre deux atomes de soufre de deux acides aminés cystéine). Pour faire apparaître les liaisons « liaisons – ponts disulfures – afficher ». Vous devez les distinguer… mais très mal !
- Pour les mettre en évidence il est possible de les **colorer** spécifiquement. L'utilisation de la palette de coloration doit vous aider. Il faut juste **choisir** « Ponts disulfures » dans la liste déroulante puis une couleur. Ils sont un peu plus visibles.
- La sélection des seuls atomes de soufre se fait dans la liste déroulante « éléments ».
- Une fois l'élément choisi, la sélection n'est effective qu'en actionnant le bouton situé à droite. Les atomes de soufre seront alors affichés en utilisant l'icône « Boules et Bâtonnets ». La sélection d'une couleur pour les atomes dans la palette termine la mise en évidence des ponts disulfures.
- Une fois ces opérations faites, **afficher** la palette de couleur et colorer le fond en blanc, puis **coller** dans un fichier Word.

On veut désormais étudier la formation des complexes immuns (= en gros l'association entre l'anticorps et « l'antigène) avec Rastop.
- Le fichier IGG-LYS.PDB contient la représentation des extrémités des chaînes lourdes et légères (voir votre schéma précédent) associées à l'antigène constitué par une molécule de lysozyme.
- **Utiliser** l'affichage en sphère, puis la coloration par chaîne pour distinguer l'antigène en rouge, l'extrémité de la chaîne lourde en bleu et celle de la chaîne légère en vert (couleurs par défaut).
- **Sélectionner** par la suite les chaînes de l'anticorps, et les **représenter** en « Boules et Bâtonnets ». L'antigène doit rester en sphères. Penser à **colorer** le fond en blanc, puis **coller** dans un fichier Word
- On veut mieux **observer** la zone de jonction entre anticorps et antigène. Pour cela, on va **réaliser** une coupe et un zoom.
- En sélectionnant Trans/Zoom, les actions sur les curseurs sont interprétées comme des translations selon l'un des trois axes. Cela permet de centrer l'observation sur la zone de contact entre anticorps et antigène.
- La fonction de coupe est commandée par un petit tableau situé en centre de la barre inférieure (front et flèche droite pour une coupe frontale). La coupe peut être copiée/collée dans Word si elle est démonstrative.

Communication des résultats :
- Approche de la structure de l'anticorps : texte, impression et schéma (en commun pour ce dernier)
- Approche des sites de liaison entre AC et AG (texte et impression). Compléter avec les informations du document 3 page 286.